



12 Offenlegungsschrift
11 DE 3433133 A1

51 Int. Cl. 4:
G 01 N 1/28
G 01 N 33/48
B 01 L 7/00
B 01 L 7/02
H 05 B 6/80

21 Aktenzeichen: P 34 33 133.6
22 Anmeldetag: 8. 9. 84
43 Offenlegungstag: 20. 3. 86

DE 3433133 A1

71 Anmelder:
Schubert, Werner, Dr.med., 4330 Mülheim, DE

72 Erfinder:
gleich Anmelder

56 Recherchenergebnisse nach § 43 Abs. 1 PatG:

DE-AS 27 53 710
DE-OS 30 06 356
DE-OS 29 32 112
DE-OS 29 15 248
DE-OS 27 39 649
DE-OS 27 20 781
DE-OS 26 14 253
US 32 27 130
EP 00 77 477

DD-Buch: Gerda Heinrich, VEB Gustav Fischer Verlag: Fibel der histologischen Technik, Jena 1955, S.4-10;

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Vorrichtung zur Organ- Gewebsfixierung

Für die Gewebsfixierung im Rahmen der histologischen Technik kann das umwelt- und gesundheitsschädliche Formaldehyd, welches konzentriert im oft verwendeten Fixierungsmittel Formalin enthalten ist, durch eine schonend durchgeführte Hitzekoagulation von ganzen Organen, Gewebe/Gewebsteilen weitgehend oder ganz ersetzt werden. Hierfür werden Ausführungsbeispiele von Geräten dargestellt, die zur Hitzekoagulation von Organen, Geweben oder Gewebsteilen wie für die rasche Fixierung von Biopsiematerial mit Denaturierung der Eiweißkörper geeignete sind.

1. Vorrichtung zur Organ/Gewebsfixierung in Anwendung der Hitzekoagulation, die für die weitere histologische Bearbeitung eine rasche und die Strukturen erhaltende Gewebsverfestigung auch ohne Formalin ergibt, dadurch gekennzeichnet, daß bei Verwendung von Wasser zur Hitzekoagulation ein Drucktopf vorhanden ist, daß der Drucktopf einen Thermostaten oder ein Wasserbad besitzt, so daß im Drucktopf über längere Zeit Temperaturen dicht unter dem Siedepunkt des Wassers vorhanden sind, daß sich im Drucktopf für die Aufnahme der Organe oder Gewebsteile ein zumindest zum Teil durchbrochener Einsatz befindet, daß der Drucktopf während des Fixierungsvorganges durch einen mit Sicherheitsventil versehenen leicht bedienbaren Deckel abgeschlossen werden kann, daß möglichst in Verbindung mit dem Einsatz, der die Organe enthält, im Innern des Drucktopfes ein Rühreffekt erzielt wird,

und daß über einem außen am Drucktopf vorhandenen Thermometer sowie Manometer die Temperatur des Innenraumes sowie der im Drucktopf vorhandene Druck abgelesen werden kann.

2. Vorrichtung zur Organ/Gewebsfixierung nach Anspruch 1

dadurch gekennzeichnet,
daß für den Thermostaten Bimetall oder sonstige technische Bauelemente zur Temperatursteuerung verwendet werden.

3. Vorrichtung zur Organ/Gewebsfixierung nach Anspruch 1-2

dadurch gekennzeichnet,
daß die Temperaturregelung dicht unter dem Siedepunkt sich konstant durch ein Wasserbad ergibt.

4. Vorrichtung zur Organ/Gewebsfixierung nach Anspruch 1-3

dadurch gekennzeichnet,
daß das Wasserbad durch eine Doppelwandigkeit des Drucktopfes besonders seines unteren Teils erreicht wird.

5. Vorrichtung zur Organ/Gewebsfixierung nach Anspruch 1-4

dadurch gekennzeichnet,

daß der im Wasserbad entweichende Dampf über einen Schlauch in ein flüssigkeitserfülltes Standgefäß abgeleitet wird.

6. Vorrichtung zur Organ/Gewebsfixierung nach Anspruch 1-5 dadurch gekennzeichnet,

daß der bereits unter Patentanspruch 1 genannte Einsatz aus mehreren Teilen besteht mit und ohne Wanddurchbrechungen für Flüssigkeitsdurchtritt für die Hitze-koagulation von ganzen Organen, Geweben oder Gewebsteilen.

7. Vorrichtung zur Organ/Gewebsfixierung nach Anspruch 1-6 dadurch gekennzeichnet,

daß der Einsatz des Drucktopfes aus Metall wie V 2 A oder auch Kunststoff und anderem Material besteht.

8. Vorrichtung zur Organ/Gewebsfixierung nach Anspruch 1-7 dadurch gekennzeichnet,

daß der die Organe aufnehmende Einsatz mit einer stabilen wirksamen Rührvorrichtung in Verbindung steht.

9. Vorrichtung zur Organ/Gewebsfixierung nach Anspruch 1-8 dadurch gekennzeichnet,

3433133

daß die Kräfte für den Rühreffekt im Innern des Drucktopfes über eine Welle von außen mittels Motor auf den Einsatz des Drucktopfes übertragen werden.

10. Vorrichtung zur Organ/Gewebsfixierung nach Anspruch 1-9 dadurch gekennzeichnet,

daß die Antriebswelle mit Kupplung für den Rührer konzentrisch vom Boden zum Einsatz des Drucktopfes über eine Abdichtung zum Boden des Drucktopfes hineingelangt.

11. Vorrichtung zur Organ/Gewebsfixierung nach Anspruch 1-10

dadurch gekennzeichnet,
daß vom Deckel her oder von anderer Stelle des Drucktopfes durch einen Motor die Rührvorrichtung betrieben wird.

12. Vorrichtung zur Organ/Gewebsfixierung nach Anspruch 1-11

dadurch gekennzeichnet,
daß der Rühr-oder Schwenkeffekt zur möglichst raschen und gleichmäßigen Hitzekoagulation der Organe/Gewebe durch Dreh-oder Schwenkbewegungen in entgegengesetzter Richtung verstärkt wird.

13. Vorrichtung zur Organ/Gewebsfixierung nach Anspruch 1-12 dadurch gekennzeichnet,

daß der hauptsächlich mit Wasser beschickte Drucktopf auch dafür verwendet wird, daß mit Formalin bereits vorfixierte Organe oder Gewebsteile wie Biopsien vom restlichen Formalin rasch befreit werden.

14. Vorrichtung zur Organ/Gewebsfixierung nach Anspruch 1-12,

insbesondere 13, dadurch gekennzeichnet,

daß insbesondere seitliche Teile des Drucktopfes in der Wandung Rohranschlüsse mit Ventilen auch zur Schlauchaufnahme besitzen, um während der Hitzekoagulation durch Zufuhr weiteren heißen Wassers, zum Beispiel mit Biopsien übernommenes Formalin, unter Abschluß des Laborraumes möglichst rasch und wirksam entfernen zu können.

15. Vorrichtung zur Organ/Gewebsfixierung nach Anspruch 1-14

dadurch gekennzeichnet,

daß für die Hitzekoagulation moderne neue Verfahren zur Anwendung kommen wie die dielektrische Erwärmung durch Mikrowellen.

16. Vorrichtung zur Organ/Gewebsfixierung nach Anspruch 1-14, insbesondere 15, dadurch gekennzeichnet,

3433133

daß die Denaturierung bzw. die Verfestigung von ganzen Organen/Organpaketen, Geweben oder Gewebsteilen für anatomische, pathologisch-anatomische Zwecke allgemein, entsprechend auch für verschiedene histologische Zwecke der verschiedenen Laboratorien, auch der Veterinär-medizin, der Lebensmitteluntersuchungen, durch Mikrowellenerwärmung ohne jeglichen Zusatz von Wasser, anderer Flüssigkeit oder Stoffen zustande kommt, sich also die Denaturierung bzw. Eiweißkoagulation mit Verfestigung der Organe bzw. der verschiedenen Gewebe unmittelbar aus dem Naturzustand ergibt.

17. Vorrichtung zur Organ/Gewebsfixierung nach Anspruch 15 und 16 und vorausgegangene Ansprüche dadurch gekennzeichnet, daß auch Hilfsreagenzien zur Aufbesserung der Gewebs- oder andere Bilder für histologische Zwecke verwendet werden bei der Hitzekoagulation bzw. Fixierung, die durch einen dielektrischen Wärmeeffekt mit Mikrowellen herbeige-führt wird.

INSTITUT FÜR PATHOLOGIE

DR. MED. W. SCHUBERT ARZT FÜR PATHOLOGIE

3433133

7

in das
Deutsche Patentamt
Zweibrückenstr.
8000 München 2

4330 Mülheim (Ruhr)
Dohne 32 - Telefon (02 08) 3 37 40
Postscheckkonto Essen 1266 43-439
Commerzbank Mülheim (Ruhr)
(BLZ 362 400 45) Konto 7 741 457

Datum: 07.09.1984

Vorrichtung zur Organ/Gewebsfixierung

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Organ/Gewebsfixierung in Anwendung der Hitzekoagulation, die für die weitere histologische Bearbeitung eine rasche und die Strukturen erhaltende Gewebsverfestigung auch ohne Formalin ergibt.

Die Organ/Gewebsfixierung zumindest für die histologische Routineuntersuchung ist heute noch im wesentlichen die Formalinfixierung mit im Wasser gelösten Formaldehyd, CH₂O. Es ist zugleich Desinfektionsmittel und wurde vor der Jahrhundertwende in die histologische Technik eingeführt, als die Antisepsis noch relativ neu und diese auch von sehr großer praktischer Bedeutung war. In den letzten Jahren wird zunehmend von verschiedenen Seiten, auch des Auslandes, auf Gesundheitsschäden durch chronisch ein-

wirkendes

Formaldehyd hingewiesen, selbst wenn

3433133

wie meist über die Luft - nur geringe Konzentration chro-
nisch auf die Haut, die Schleimhäute, in die Atemwege
gelangt. Bei Ratten sind Nasenschleimhautkrebs durch
Formaldehyd künstlich wiederholt erzeugt worden. Hierüber
berichtete mit weiteren Erfahrungen der Toxikologe Hartmut
Ueleke: Wo liegen Sicherheit und Gefahren von Formaldehyd ?
Umweltmedizin 6, (1983) 72-73. USA-Forscher vermuten sogar,
daß durch Formaldehyd auch Nieren- und Hirntumoren entstehen
können. Selbst Keimschäden sollen bei chronischer unter-
schwelliger Formaldehydeinwirkung nach Aussage eines deutschen
Toxikologen möglich sein.

Bei der für die histologische Bearbeitung allgemein er-
forderlichen Gewebshärtung handelt es sich nach H.Ch.Burck
um einen Vernetzungsvorgang der Eiweiße untereinander. Die
4%ige Formalinlösung dringt mit geringer Härtung über Nacht
(16 Stunden) 4 mm tief, in 40 Stunden 6 mm tief von beiden
Seiten in ein größeres Lebergewebsstück ein. 5 mm dicke
Gewebsscheiben sind bei Zimmertemperatur in Stunden, in
Thermostat (35-70°) in einigen Minuten sicher vollständig
fixiert (für Schnellschnittdiagnostik). Hans Christian Burck,
Histologische Technik, Thieme Verlag, Stuttgart 1973.

W. Schubert hatte sich Anfang der 50er Jahre bereits mit Wirkungen der Unterdruckfixierung ebenfalls in Anwendung von Formalin beschäftigt, das längst nicht immer die erwünschte Wirkung erbrachte. Bei später durchgeführten zahlreichen Biopsieuntersuchungen stellte er weitere Mängel der Formalinwirkung fest, insbesondere störte aber sehr eine bei der Durchführung der histologischen Technik über Jahre unvermeidbare Haut- und Körperschädigung des praktisch stets aus Formalin freiwerdenden ätzenden Formaldehyds. Aber abgesehen von dieser Umweltbelastung zeigt Formaldehyd auch beim technischen Einsatz an Organen und Geweben zur Fixierung Mängel. Erinnert sei an Schalenbildung um Organe wie Milz und Gehirn, während im Innern solcher Organe die Fäulnis mit Erweichung voranschreitet, auch autolytisch aseptische Prozesse durch Formalin nicht oder nicht ausreichend verhindert werden. Beispielsweise kommt auch bei stark schleimigem Gewebe wie bei der inneren Gewebsschicht der Gallenblase die Formalinfixierung oft nur zögerlich in Gang.

Es sind nun bereits 5 Jahre her, daß ich mich nach einem wesentlich umweltfreundlicherem Verfahren als Ersatz für die Formalinfixierung umsah und dabei auf die Möglichkeit der Hitzekoagulation stieß, die auch technisch

relativ leicht mit reproduzierbaren Ergebnissen durchführbar ist. In "Methoden der Histologischen Technik" berichtete F. Roulet 1948 bereits über die sogenannte Kochmethode, ein noch relativ grobes Verfahren:

"Zur Fixierung eiweißhaltiger, in dem Gewebe reichlich enthaltender Flüssigkeit wie zum Beispiel Lungenoedem, Cysteninhalt, eiweißhaltiger Harn in Harnkanälchen werden kleine möglichst ohne Quetschungen herausgeschnittene Gewebswürfel in kochendes Formalin geworfen, 1-2 Minuten fixiert und darauf in Alkohol nachgehärtet".

Unser Hitzeckoagulationsverfahren beruht auf der tausendfach von mir überprüften Tatsache, daß auch ohne Formalin durch heißes Wasser allein oder mit gewissen aber nicht maßgeblichen Zusätzen bei 100° C oder bei einer wenig darunter liegenden Wassertemperatur eine für Gefrierschnitte sowie zugleich für Paraffinschnitte zumindest für die Routineuntersuchung geeignete Gewebsverfestigung erreichbar ist. Durch den Versand gequetschte und verformte Organe wie der Magen, Darm erhielten durch eine Hitze-koagulation wieder weitgehend die ursprüngliche Form

zurück, was wir auf eine durch die Hitzeeinwirkung sich ergebende Restkontraktion zurückführen; sonst leicht zu übersehende kleine Geschwüre wurden nach der Heißwassereinwirkung mit Zusätzen besser erkennbar. Beachtliche sekundäre Schrumpfung wurde vereinzelt bei durch Fäulnis stark elongierter Nabelschnur einer Totgeburt beobachtet, was aber auch den Hinweis gibt, daß durch die Fäulnis selbst solche Elongationen zustande kommen.)

(Histologisch-mikroskopisch fielen hingegen bei nur wenigen Hitzekoagulationsfixierungen eigen-tümliche Streifungen besonders im sehr derben Bindegewebe auf, die fraglos Kunstprodukt darstellten infolge der Hitzekoagulation, wobei ich annehme, daß diese Streifenbildungungen Ausdruck von unerwünschten Wärmezonen bei der Hitzekoagulation mit Heißwassereinwirkung sind, sich streifig in Teilen des Gewebes Hitzestau und Eiweißausfällung ergibt, was mit der von Burck beschriebenen "Substanzflucht" verglichen werden kann. Diese "Substanzflucht" sei Folge von Konzentrationsunterschieden des Alkohols

beim Eindringen ins Gewebe.

Nachdem ich über Jahrzehnte mit Formalin, somit Formaldehyd, für histologische Zwecke umging, halte ich es aus diesen und weiteren Gründen nicht mehr für vertretbar, Formalin für die meisten histologischen Routineuntersuchungen einzusetzen.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, für die somit notwendige Hitzekoagulation zur Fixierung von Organen, Geweben/Gewebsteilen unter Ausschaltung weitgehend der umweltschädlichen Formalinfixierung ein geeignetes Gerät vorzustellen, das erlaubt, schonend und umweltfreundlich Organe, Gewebe/Gewebsteile rasch und dennoch unter Erhaltung auch der feineren Gewebsstrukturen zu verfestigen bzw. in geeigneter Form für die weitere histologische Technik zu fixieren.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß bei Verwendung von Wasser zur Hitzekoagulation ein Drucktopf vorhanden ist,

daß der Drucktopf einen Thermostaten oder ein Wasserbad besitzt, so daß im Drucktopf über längere Zeit Temperaturen dicht unter dem Siedepunkt des Wassers vorhanden sind,

daß sich im Drucktopf für die Aufnahme der Organe oder Gewebsteile ein zumindest zum Teil durchbrochener Einsatz befindet,

daß der Drucktopf während des Fixierungsvorganges durch einen mit Sicherheitsventil versehenen leicht bedienbaren Deckel abgeschlossen werden kann,

daß möglichst in Verbindung mit dem Einsatz, der die Organe enthält, im Innern des Drucktopfes ein Rühreffekt erzielt wird,

und daß über einem außen am Drucktopf vorhandenen Thermometer sowie Manometer die Temperatur des Innenraumes sowie der im Drucktopf vorhandene Druck abgelesen werden kann.

7
Weitere Ausgestaltungen der Erfindung sind aus den Patentansprüchen 2-17 zu entnehmen, wobei insbesondere noch darauf hingewiesen wird, daß sich auch durch

Mikrowelleneinwirkung dielektrisch in Organen bzw. Geweben Erwärmung und somit auch Hitzekoagulation ergibt, auch ohne daß zusätzlich Wasser oder andere Zusätze, die zum Beispiel der Isotonie dienen, bei der Hitzekoagulation erforderlich sind (Fig.3).

Die mit der Erfindung erzielten Vorteile bestehen insbesondere darin, daß die Eiweißdenaturierung durch Formalin bzw. Formaldehyd in wässriger Lösung bei meist hoher Konzentration von $H_2C=O$ zur Organ- oder Gewebsfixierung durch die Hitzekoagulation recht schonend für das Gewebe unter Erhaltung der feineren Strukturen und ebenfalls fixierend ersetzt werden kann, so daß exogene Intoxikationen, Gewebsschäden für Lebewesen wie für die an der Laborarbeit Beteiligten, auch weitere potentielle Gefährdungen durch chronisch einwirkendes Formaldehyd entfallen, die zur Krebsentstehung oder Keimschädigung führen könnten. Aber auch technisch bietet in Berücksichtigung auch der Isotonie durch Zugaben im heißen Wasser die

Hitzekoagulation nach Anspruch 1 im durch Thermostat gesteuerten Drucktopf möglichst zugleich mit Rühreffekt Vorteile vergleichsweise zur Formalinfixierung, wobei auf die Schalenbildung bei Formalinfixierung besonders bei größeren Organen erneut beispielsweise hingewiesen wird. Die Hitzekoagulation geht grundsätzlich rascher vonstatten als die Formalinfixierung. Die Schneidfähigkeit von hitzefixiertem Gewebe für Gefrier- sowie Paraffinschnitte war gut, und auch die feineren Strukturen, besonders ablesbar an der Plasmazelle, ließen sich mikroskopisch sehr gut erkennen. Wie F. Roulet, dessen Kochmethode schon oben wörtlich vermerkt wurde, haben wir ebenfalls oft die Heißwasserfixierung mit Alkoholeinwirkung kombiniert, so daß nun Quellungen insbesondere der für die Tumorbeurteilung wichtigen Zellkerne noch weiter zurückgedrängt wurden. Formalinniederschläge entfallen. Das Laborraumklima wird wesentlich verbessert, auch angrenzende Räume werden frei von Formalingeruch, da das Formaldehyd als Gas bekanntlich sogar Wände durchdringt.

Ein Ausführungsbeispiel der Erfindung ist in der Zeichnung dargestellt und wird im folgenden näher beschrieben.

Fig. 1 zeigt den Durchschnitt einer Vorrichtung, die durch Hitzekoagulation in Wasser mit Zusätzen zur Isotonie zur Gewebsfixierung von ganzen Organen/ Organpaketen, von Geweben oder Gewebsstücken, auch entsprechend von Biopsien geeignet ist. Dazu gehören der Drucktopf 1, die am Boden desselben befindliche Heizung 2, dazwischengesetzt als empfindlicher Thermostat ein mit dem Drucktopf verbundenes Wasserbad 3 (dort doppelwandig). Der Abschluß des Drucktopfes erfolgt durch den Deckel 6 mit seitlicher Dichtung und dem Sicherheitsventil 7. An Armaturen hat der Drucktopf ein Thermometer 8 und ein Manometer 9, innen befindet sich der Einsatz für die Aufnahme verschiedener Organe oder Gewebsteile, wobei auch ein Sonderfach für die Alkoholfixierung eingeschaltet sein kann. Das weitgehend geschlossene Wasserbad 3 hat einen Schlauch 4, der den im Wasserbad entstandenen Dampf in ein zum Teil mit Wasser gefülltes Standgefäß 5 leitet.

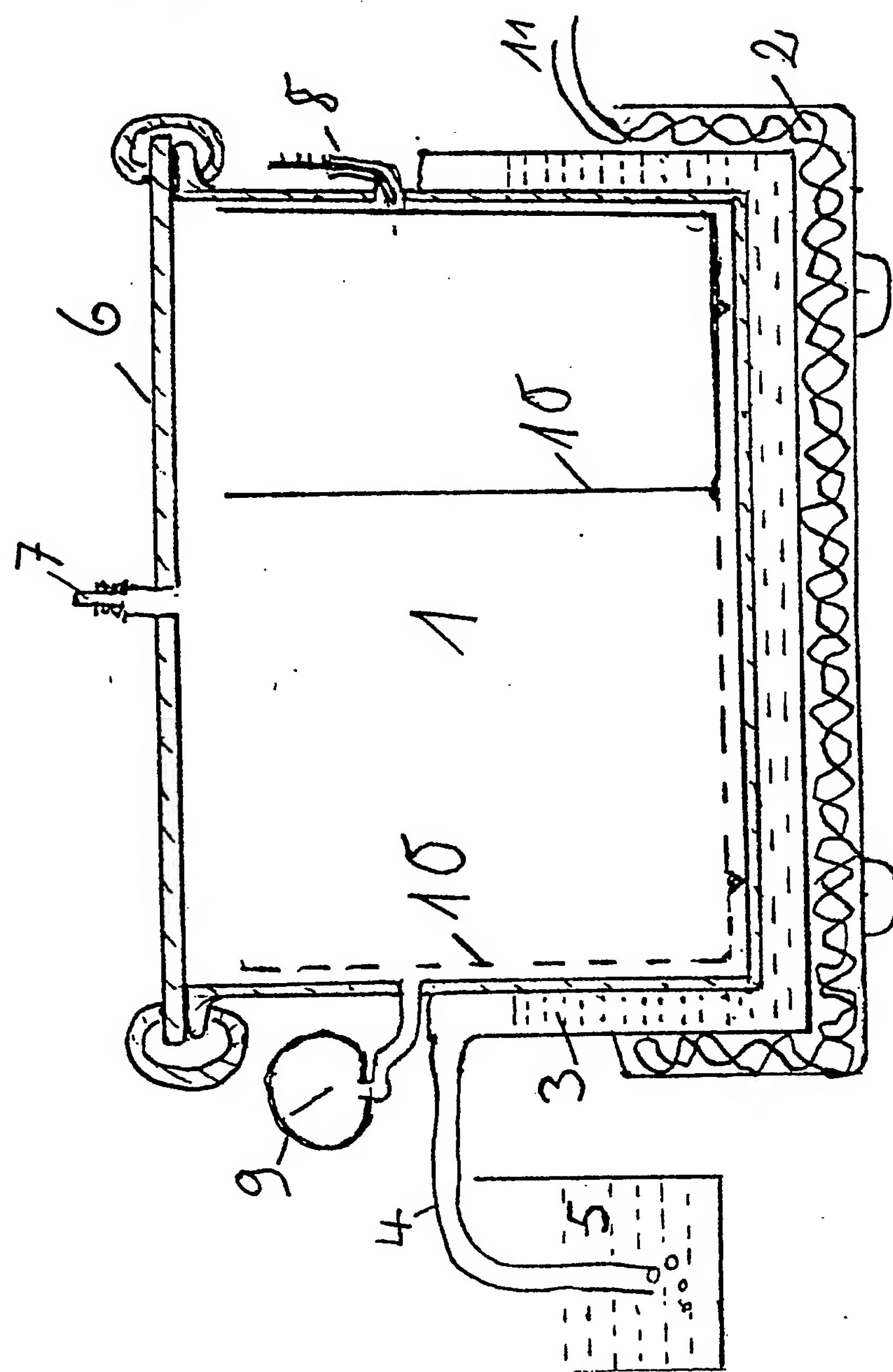
Fig. 2 zeigt eine Rührvorrichtung am Boden des Drucktopfes mit der Welle 12, die Einrastung des Einsatzes 10 in eine Fuge axial im inneren Teil dieser Welle (12), so daß bei der Drehung der Welle der Einsatz im Drucktopf mitgenommen wird, wobei auch gegensinnige Drehung links- und rechts herum zustande kommen kann. Seitlich der Welle befindet sich am Boden des Drucktopfes 1 mit einer geeigneten Abdichtung der innere mittlere Teil des Wasserbades 3 und weiter darunter auch der innere Teil des Heizkörpers 2.

Fig. 3 zeigt schematisch eine Mikrowellenvorrichtung zur dielektrischen Erwärmung bzw. Hitzekoagulation eines darin hineingegebenen Gewebsstückes 13, ohne daß Wasser oder andere Substanzen zur Denaturierung bzw. Fixierung des Gewebsmaterials einwirken müssen. 11 stellt den Elektroanschluß dar.

Legende:

1. Drucktopf des Niederdruckbereiches.
2. Heizkörper für diesen Drucktopf.
3. Wasserbad als Thermostat zwischen Heizkörper und Drucktopf.
4. Schlauch für die Ableitung entstehenden Dampfes des Wasserbades.
5. Standbehälter mit Wasser zur Aufnahme des Dampfes.
6. Gasdicht abschließender Deckel für den Drucktopf 1.
7. Sicherheitsventil des Deckels.
8. Thermometer zur Messung der Temperatur im Drucktopf.
9. Manometer.
10. Überwiegend durchbrochener Einsatz im Drucktopf.
11. Elektroanschluß.
12. Antriebswelle für eine im Wechsel sich gegensinnig drehende Rührvorrichtung am Boden des Drucktopfes (Fig.2).
13. Ein Gewebsstück, welches dielektrisch zur Wärmeentwicklung Mikrowellen zur Hitzekoagulation ausgesetzt wird. (Fig.3).

Fig. 1



- 19 -

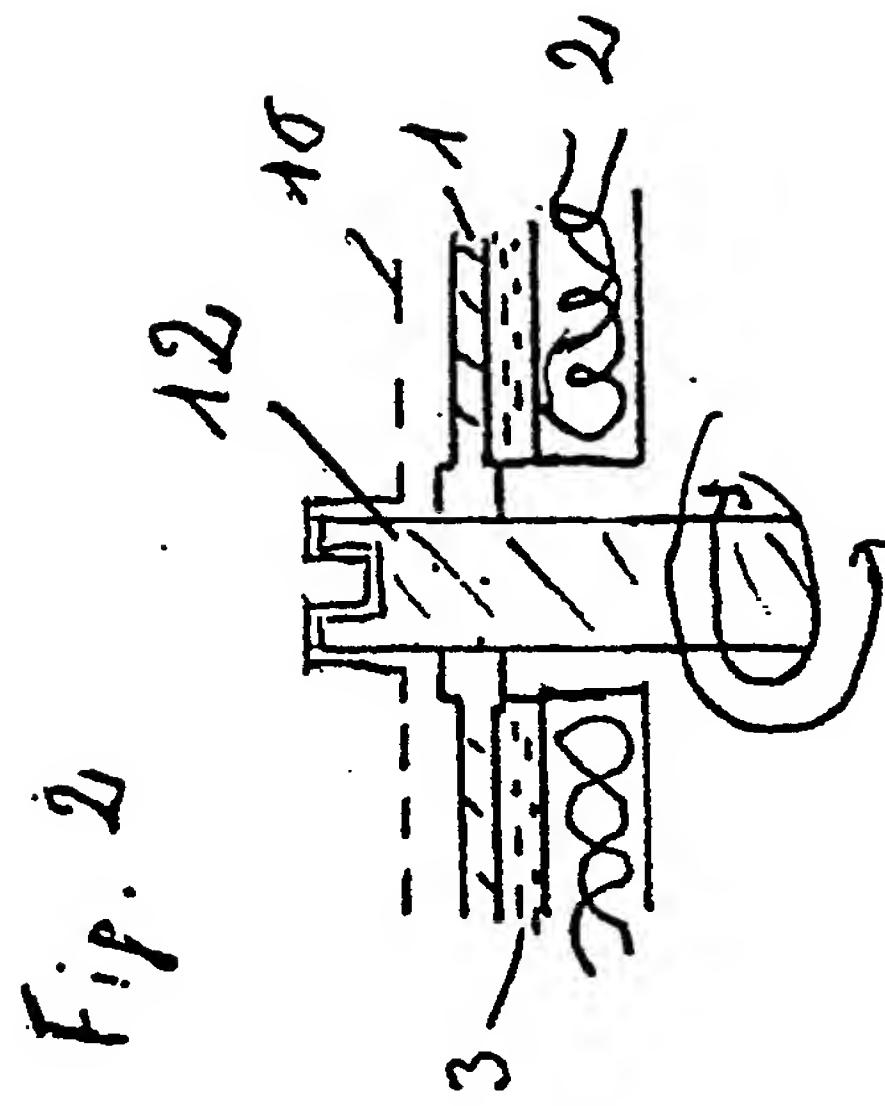


Fig. 2

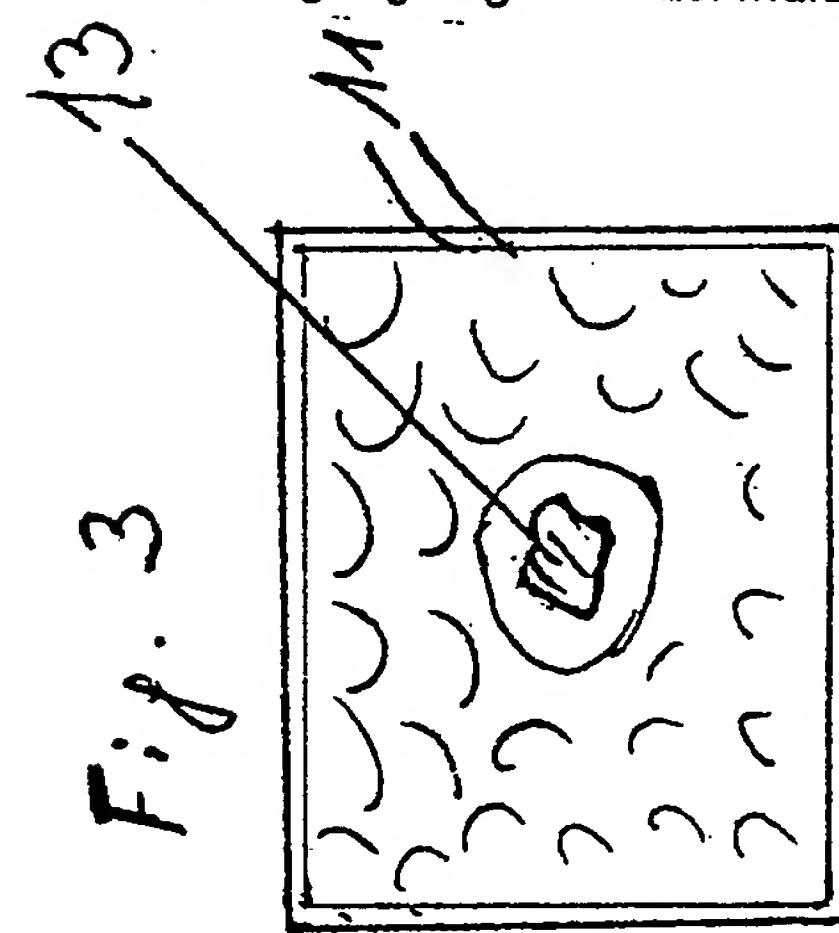
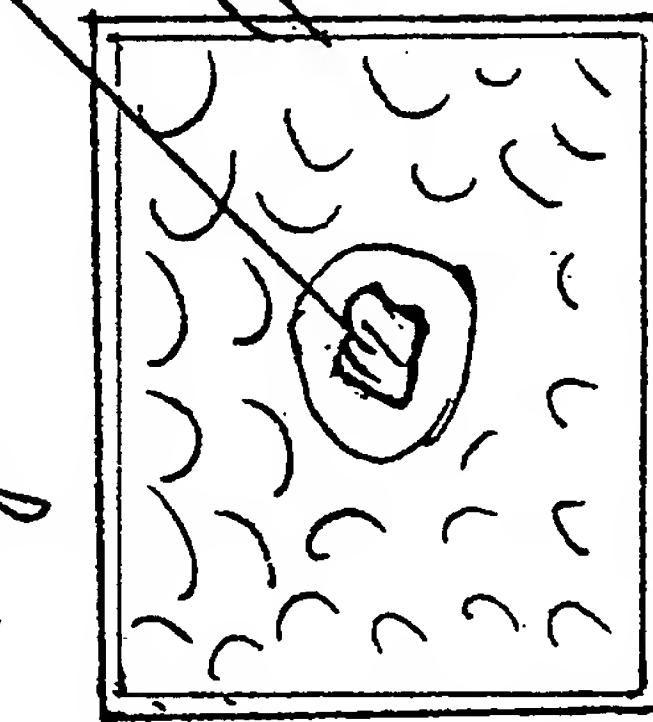


Fig. 3



Nummer: 34 33 133
Int. Cl. 4: G 01 N 1/28
Anmeldetag: 8. September 1984
Offenlegungstag: 20. März 1986